

(11)Publication number : 2002-325571  
 (43)Date of publication of application : 12.11.2002

(51)Int.Cl. C12N 15/09  
 A61K 35/44  
 A61K 35/48  
 A61K 48/00  
 A61P 27/02  
 A61P 27/06  
 C12N 5/10

(21)Application number : 2001-133721 (71)Applicant : PUROTEKKU:KK  
 (22)Date of filing : 27.04.2001 (72)Inventor : TAKAHASHI MASAYO  
 HARUTA MASATOSHI

#### (54) METHOD FOR INDUCING DIFFERENTIATION OF RETINA

##### (57)Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a method for inducing differentiation of a retinal nerve cell, capable of making a cell derived from a nerve stem cell express its function by making the retina take the nerve stem cell and making the taken nerve stem cell differentiate, so that a marker of optic cell or a marker of bipolar cell can be expressed concretely, and to provide the retinal nerve cell capable of expressing the marker of optic cell or the marker of bipolar cell, so that the retinal nerve cell is suitably used to be transplanted to the retina or the like.

**SOLUTION:** This method for inducing the differentiation of the retinal nerve cell comprises obtaining the nerve stem cell or a nerve stem precursor cell from a cell derived from the eyeball tissue or an embryonic stem cell, introducing a homeobox gene specific to the retina into the nerve stem cell or the nerve stem precursor cell, and culturing the obtained cell under a differentiation-inducing condition. The retinal nerve cell is obtained by the method for inducing the differentiation of the retinal nerve cell.

##### \* NOTICES \*

JPO and INPI are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

#### CLAIMS

##### [Claim(s)]

[Claim 1] A differentiation-inducing method of a retinal nerve cell culturing a cell which obtained a neural stem cell or a neuronal precursor cell, and was obtained from an eyeball organization origin cell or embryonic stem cells by introducing a retina specific homeobox gene into this neural stem cell or a neuronal precursor cell under a differentiation-inducing condition.

[Claim 2] A differentiation-inducing method according to claim 1 that an eyeball organization origin cell is one sort chosen from a group which consists of an embryo nerve net film, a ciliary

body pigment-epithelium cell, and retinal pigment epithelial cells.

[Claim 3]A differentiation-inducing method according to claim 1 or 2 that a retina specific homeobox gene is at least one sort chosen from a group which consists of Crx, Chx10, Pax6, and Rx.

[Claim 4]A differentiation-inducing method given in claim 1 – 3 any 1 paragraphs which are culture under existence with retinoic acid and a blood serum of differentiation-inducing conditions.

[Claim 5]A differentiation-inducing method according to claim 4 that differentiation-inducing conditions are conditions cultivated by DMEM/F12 which contained N<sub>2</sub> supplement under existence with retinoic acid and a blood serum.

[Claim 6]A retinal nerve cell obtained by the differentiation-inducing method of a retinal nerve cell given in claim 1 – 5 any 1 paragraphs.

[Claim 7]The retinal nerve cell according to claim 6 which presents an opsin positivity or a PKC positivity.

---

[Translation done.]

\* NOTICES \*

JPO and INPI are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.

2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.

3. In the drawings, any words are not translated.

---

## DETAILED DESCRIPTION

---

### [Detailed Description of the Invention]

#### [0001]

[Field of the Invention] This invention relates to the retinal nerve cell obtained by the differentiation-inducing method of a retinal nerve cell and this differentiation-inducing method of transplanting to the retina and providing the cell which was suitable for autotransplantation especially.

#### [0002]

[Description of the Prior Art] In recent years, existence of the neural stem cell in a brain and a spine comes to be accepted, and it has a hope for a transplantation therapy, nervous regeneration medicine, etc. to the Parkinson's disease and degeneratio pigmentosa retinae using this stem cell.

[0003] It is reported by the replanting experiment using the neural stem cell of a rat or a mouse about the neural stem cell that the neural stem cell transplanted in the brain moves to a suitable position, and specializes in neurone or a glial cell.

[0004] In the regeneration medicine in an ophthalmologic field, when an adult rat hippocampus origin neural stem cell is poured in into the vitreous chamber of the rat on two to after-the-birth the 7th in which nervous differentiation is advancing, this neural stem cell carries out migration of it to the retina, and carries out take to it, and it specializes in various retinal cell Mr. cells, and also reproducing a nerve fiber is known.

[0005] However, the actual condition is not having resulted in the manifestation of the function of the retinal nerve cell of not specializing but recognizing light until it functions as a retinal nerve cell.

[0006] Therefore, the means with possible revealing a neural stem cell to the retina and making

take and the cell which made specialize and was derived from this neural stem cell reveal the function as a retinal nerve cell is demanded.

[0007]

[Problem(s) to be Solved by the Invention]It aims at providing the differentiation-inducing method of a retinal nerve cell with that this invention reveals a neural stem cell to the retina, and makes take and the cell which made specialize and was derived from this neural stem cell reveal a function, and possible making the marker or bipolar cell marker of visual cells specifically reveal. An object of this invention is to provide the retinal nerve cell which presents the suitable marker or bipolar cell marker of visual cells for the transplantation to the retina etc.

[0008]

[Means for Solving the Problem]Namely, this invention, [1]A differentiation-inducing method of a retinal nerve cell culturing a cell which obtained a neural stem cell or a neuronal precursor cell, and was obtained from an eyeball organization origin cell or embryonic stem cells by introducing a retina specific homeobox gene into this neural stem cell or a neuronal precursor cell under a differentiation-inducing condition, [2]The above which is one sort chosen from a group which an eyeball organization origin cell becomes from an embryo nerve net film, a ciliary body pigment-epithelium cell, and retinal pigment epithelial cells [1]A differentiation-inducing method of a statement, [3]The above which is at least one sort chosen from a group which a retina specific homeobox gene becomes from Crx, Chx10, Pax, and Rax [1]or[2]A differentiation-inducing method of a statement, [4]The above which is culture under existence with retinoic acid and a blood serum of differentiation-inducing conditions [1]–[3]A differentiation-inducing method given in any 1 paragraph, [5]The above which is that differentiation-inducing conditions cultivate by DMEM/F12 which contained N<sub>2</sub> supplement under existence with retinoic acid and a blood serum [4]A differentiation-inducing method of a statement, [6]Above[1]–[5]In a retinal nerve cell and a row which are obtained by the differentiation-inducing method of a retinal nerve cell given in any 1 paragraph [7]The above which presents an opsin positivity or a PKC positivity [6]It is related without a retinal nerve cell of a statement.

[0009]

[Embodiment of the Invention]The differentiation-inducing method of the retinal nerve cell of this invention has one big feature in culturing the cell which obtained the neural stem cell or the neuronal precursor cell, and was obtained from the eyeball organization origin cell by introducing a retina specific homeobox gene into this neural stem cell or a neuronal precursor cell under a differentiation-inducing condition.

[0010]According to the differentiation-inducing method of the retinal nerve cell of this invention, by the case where transplanted the hippocampus origin neural stem cell to the retina, and it is made to specialize, making it revealed demonstrates the outstanding effect of the ability to make the function of the difficult visual cells or a bipolar cell reveal.

[0011]Since the cell which reveals the function of visual cells or a bipolar cell and which presents an opsin positivity or a PKC positivity can specifically be obtained according to the differentiation-inducing method of the retinal nerve cell of this invention, the outstanding effect that a useful cell can be developed to the regeneration medicine of the retina is demonstrated.

[0012]The organization which is used for obtaining a neural stem cell or a neuronal precursor cell, and gets in the differentiation-inducing method of this invention, By introducing a retina specific homeobox gene into the obtained cell, what is necessary is just the marker of visual cells, for example, opsin, a marker of a bipolar cell, and an organization that may reveal PKC, and, specifically, a \*\*\*\* inner layer etc. are mentioned to an eyeball organization and a twist concrete target. This organization may be of adult origin, or may be of the individual origin of fetus.

[0013]In the differentiation-inducing method of this invention, a neural stem cell or a neuronal precursor cell may be obtained from these embryonic stem cells using embryonic stem cells.

[0014]as the method of deriving to a neural stem cell or a neuronal precursor cell from said embryonic stem cells -- literature of Kawasaki, Sasai and others [Kawasaki, H., Sasai Y., Neuron., and 2000 Oct; 28(1):31–40] etc. -- the technique of a statement, etc. are mentioned. Refer to a "molecular biology protocol", the Nankodo issue, etc. for conditions, such as culture of embryonic stem cells, and maintenance, for example.

[0015]As said organization origin cell, an embryo nerve net film, a ciliary body pigment-epithelium cell, retinal pigment epithelial cells, etc. are mentioned.

[0016]By Dispase, EDTA, etc., process said organization origin cell and the organization which extracted by the suitable means, for example subsequently, Trypsinization is carried out, it cultivates until it dissociates and becomes confluent by a still more suitable culture medium to a single cell, and it is extracted trypsinization and by carrying out collagenase treatment, and deals in the obtained cell. Here, when cultivating when extracting a cell, culture media, such as a culture medium containing the below-mentioned basic fibroblast growth factor, a culture medium containing an epidermal growth factor, and a culture medium containing LIF (leukocyte migration inhibition factor), can be used.

[0017]A neural stem cell or a neuronal precursor cell reveals markers, such as NESUCHIN.

[0018]The neural stem cell or neuronal precursor cell of this ciliary body pigment-epithelium cell origin is also contained in the range of this invention.

[0019]Although said neural stem cell or a neuronal precursor cell may be obtained as neural sphere containing this, it may present the following transgenics and differentiation inducing to a nerve with this neural sphere in this invention.

[0020]The serum free medium containing said basic fibroblast growth factor (bFGF) [Henceforth a bFGF content serum free medium] If it carries out, DMEM/F12 containing N<sub>2</sub> supplement, etc.

is mentioned. It is desirable [ the content of said basic fibroblast growth factor in this culture medium ] preferably that it is 40 ng/more than ml 20 ng/more than ml 10 ng/more than ml.

[0021]As an N<sub>2</sub> supplement, it is an insulin. 5 microg [ // ml ] and transferrin 100microg/ml, projet stolon 20nM, putrescine 100microM, sodium selenate 30nM is mentioned.

[0022]Conditions, such as temperature in the culture in a bFGF content serum free medium, an oxygen density, and carbon dioxide levels, can be suitably set up according to a cell.

[0023]setting in a generating process as a retina specific homeobox gene -- the field of an eye -- having a specific pattern of manifestation -- and a field -- the gene which controls specific morphogenesis, and the gene which participates in the manifestation of a differentiation character are mentioned. Specifically, Crx, Chx10, Pax6, Rax, etc. are mentioned. In the differentiation-inducing method of this invention, from a viewpoint which can make a visual cell marker reveal by introduction to a neural stem cell or a neuronal precursor cell, preferably, Crx or Chx10 is mentioned and Chx10 is preferably mentioned from a viewpoint which can make a bipolar cell marker reveal. The base sequence of said Crx is shown in GenBank accession number:U77615.

[0024]As an introducing method of said retina specific homeobox gene to a neural stem cell or a neuronal precursor cell, For example, the transgenics method using an adenovirus vector, electroporation, the transgenics method using a retroviral vector, the transgenics method using an adeno-associated virus, a RIPOFE cushion, electroporation, etc. are mentioned. From a viewpoint of introductory efficiency, the transgenics method using an adenovirus vector and the transgenics method using a retroviral vector are desirable preferably.

[0025]Subsequently, the neural stem cell or neuronal precursor cell by which transgenics was carried out is cultured under a differentiation-inducing condition suitable for the differentiation to a retinal nerve cell.

[0026]As said differentiation-inducing conditions, the culture under existence with retinoic acid and a blood serum, etc. are mentioned. Here, as a culture medium by which it is used for culture and in which it deals, DMEM/F12 culture medium containing N<sub>2</sub> supplement, etc. are mentioned.

Conditions, such as temperature at the time of culture, an oxygen density, and carbon dioxide levels, can be suitably set up according to a cell.

[0027]It is more than 0.1microM, and as for the amount of said retinoic acid used, it is desirable preferably that it is more than 0.5microM, it is below 10microM and it is desirable preferably that it is below 5microM.

[0028]As for the amount of said blood serum used, at the time of differentiation inducing, it is desirable that it is about 1%.

[0029]The cell which specialized by culture of the neural stem cell or neuronal precursor cell

under differentiation-inducing conditions by which transgenics was carried out. When the introduced gene is a Crx gene, the opsin positivity which is a marker of visual cells is presented. And it has the feature of presenting a beta-III tubulin positivity, a GFAP positivity, etc. which are the markers of a nerve cell. When the introduced gene is Chx10 gene, it has the feature of presenting the PKC positivity which is a marker of a bipolar cell, and presenting a beta-III tubulin positivity, a GFAP positivity, etc. which are the markers of a nerve cell. Therefore, it can use by using this cell as a retinal nerve cell. The retinal nerve cell obtained by this differentiation-inducing method is also contained in this invention.

[0030]The application as a cell [as opposed to disease patients, such as a retina degenerative disease, for example, degeneratio pigmentosa retinae, age-related macular degeneration, amotio retinae, glaucoma, and vasa-sanguinea-retinae obstruction, in the retinal nerve cell obtained by the differentiation-inducing method of this invention] for transplantation is expected. Since the neural stem cell obtained by this invention is uniform, the cell of quantity is obtained enough and cryopreservation is made, there is an advantage of enabling a planned therapy.

[0031]According to the differentiation-inducing method of this invention, changing the direction of differentiation is also expected by addition of cytokine, or introduction of a foreign gene.

[0032]

[Example]The rat retina of culture viviparous 18 age in day of Example 1 (1) retina or the viviparous 11-week old Homo sapiens retina was extracted. The serum free medium which contained the basic fibroblast growth factor (bFGF) 20 ng(s)/ml [presentation: It cultivated at 37 \*\* under 5%CO<sub>2</sub> and 20%O<sub>2</sub> using DMEM/F12+N<sub>2</sub> supplement]. In the place which the cell fully increased, it is 0.125% trypsin about a culture. By [the product made by Gibco], it processes for 5 minutes, it continues at 37 \*\*, and is on a collagen coat dish. [medium composition: Subculture was carried out for 30 days at 37 \*\* under 5%CO<sub>2</sub> and 20%O<sub>2</sub> by DMEM/F12+N<sub>2</sub> supplement +bFGF]. About research of the Homo sapiens embryo retina, the approval of Bioethical Committee, Kyoto University, was received, and was performed. Following and N<sub>2</sub> supplement is an insulin. 5 microg [ml] /, transferrin 100 microg [ml] /, projet stolon 20nM, putrescine 100microM, sodium selenate It is 30nM.

[0033]The culture medium which removed bFGF from the culture medium of the culture on the occasion of differentiation inducing, and added fetal calf serum (FBS) and retinoic acid [presentation: It cultivated for two weeks at 37 \*\* under 5%CO<sub>2</sub> and 20%O<sub>2</sub> by DMEM/F12+N<sub>2</sub> supplement+0.5microM RA].

[0034]As a result, it turns out that isolation culture of neural sphere considered that a neural stem cell is included in his being surprised by the same method as a hippocampus origin neural stem cell from a rat and the human embryo retina as shown in drawing 1 can be carried out.

[0035]Subsequently, the frozen section was produced for neural sphere after fixing to a slide glass by paraform ARUDE hide 4%.

[0036]The antibody to NESUCHIN used as the marker of a neural stem cell about the obtained section Immunity dyeing was performed by [the product made by Pharmingen].

[0037]As a result, it is shown that almost all cells are NESUCHIN positivities. With retinoic acid, after differentiation inducing, beta- III tubulin and a GFAP positive cell are seen, and an immature nerve and specializing in a neuroglia are shown.

[0038](2) The eyeball of the nerve differentiation inducing 3 from a ciliary body pigment-epithelium cell - a 4-week old DA rat was extracted, the front sclera was cut open a little to cyclic, and the anterior eye segment was separated from the equatorial part. After removing the retina thoroughly, a lens and ciliary body colorlessness matter epithelial cells were removed. After isolating a ciliary body organization, each organization was processed at 37 \*\* by Dispase (1000U/ml) for 15 minutes, and, subsequently was processed at the room temperature by EDTA 0.05% for 20 minutes.

[0039]As the pigment-epithelium cell side became the undersurface, it made it paste on the dish which carried out the laminin coat, and about some ciliary body organizations, indirect arrival culture was performed at 37 \*\* under 5%CO<sub>2</sub> and 20%O<sub>2</sub> on the 20th using said bFGF content

serum free medium.

[0040]For differentiation inducing to a nerve, it is a fetal-calf-serum content culture medium about a culture medium succeedingly. [presentation: It exchanged for DMEM/F12+N<sub>2</sub> supplement + retinoic acid], and culture was continued similarly.

[0041]As a result, the cell like neural sphere was obtained from the ciliary body pigment-epithelium cell. Before differentiation inducing to a nerve, the cell of the NESUCHIN positivity was checked, and beta- III tubulin and a GFAP positive cell existed with a small number too after differentiation inducing.

[0042](3) The transgenics by production of a recombinant adenovirus vector, production of below transgenics and a recombinant adenovirus vector, and this vector is a method of Kanegae, and Saito and others. [literature name: It carried out according to a transgenics & manifestation analysis laboratory procedure, the 27-42nd page, (1997), and Yodosha issue].

[0043]The GFP gene which is the Crx gene and reporter gene which are specific homeobox genes of visual cells was amplified, respectively, and each gene started with the restriction enzyme was included in the manifestation cosmid cassette. It amplified using the transformant produced about the Crx gene, Chx10 gene, and the GFP gene by transforming host Escherichia coli by each of the plasmid which held the plasmid holding Crx, the plasmid holding Chx10, and GFP, respectively.

[0044]Subsequently, the adenovirus which reveals each gene was produced by the homonous rearranging method. Subsequently, the obtained recombinant adenovirus was infected with 293 cells, and was proliferated, and a virus was refined by the step gradient method using a cesium chloride.

[0045]Subsequently, the refined Crx gene expression adenovirus, Chx10 gene-expression adenovirus, or GFP gene expression adenovirus was infected to each of the neural stem cell of ciliary body pigment-epithelium cell origin (or neuronal precursor cell).

[0046]About the obtained infected cell, they are nerve differentiation conditions. [The conditions of DMEM/F12+N<sub>2</sub> supplement+1% FBS+20ng/ml bFGF] Downward, it cultivated succeedingly.

[0047]The effect given to nerve differentiation in immunocytochemistry analysis was judged as follows about each of the Crx gene expression adenovirus infection cell, the Chx10 gene-expression adenovirus infection cell, and the GFP gene expression adenovirus infection cell.

[0048]About the cultured cell, the culture medium was fixed to the slide glass after suction removal using paraformaldehyde 4%, and it blocked using skim milk.

[0049]Various primary antibodies known as various kinds of neural markers Each dilution obtained by diluting [an anti-NESUCHIN antibody, anti-neurofilament 200 antibody, anti-MAP5 antibody, an anti-beta- III tubulin antibody, an anti-GFAP antibody, and an anti-opsin antibody] to optimum dilution magnification and the fixed cell were made to react. Subsequently, the second antibody labeled fluorescently It was made to visualize using [the product made by Amersham].

[0050]About the visualized marker, while observing with the fluorescence microscope, photograph recording of the part was carried out using the confocal microscope. A result is shown in drawing 2.

[0051]As shown in drawing 2, using an adenovirus vector After introducing Crx or Chx10, when the cell of an opsin positivity which is a marker of visual cells when differentiation inducing is carried out and Crx is introduced is seen and Chx10 is introduced, it turns out that the PKC activity which is a marker of a bipolar cell is seen. On the other hand, when a gene was not introduced, or when differentiation inducing was carried out after introducing a GFP (green fluorescein protein) gene by an adenovirus vector, an opsin positive cell was not accepted.

[0052]It is suggested from the above result that an undifferentiated neural stem cell (or neuronal precursor cell) is obtained from the rat fetus retina and the Homo sapiens embryo retina, and a rat ciliary epithelium. It is suggested by differentiation inducing that a part of neural stem cell (or neuronal precursor cell) specializes in a nerve and a gloea. it is shown by by obtaining the cell of an opsin positivity which is a marker of visual cells, for example, introducing Chx10 gene by introducing a homeobox gene, for example, a Crx gene, that the cell of a PKC positivity which is

a marker of a bipolar cell is obtained.

[0053]

[Effect of the Invention] According to the differentiation-inducing method of this invention, revealing a neural stem cell to the retina and making take and the cell which made specializing and was derived from this neural stem cell revealing a function, and the outstanding effect of the ability to make the marker or bipolar cell of visual cells specifically revealing are done so. The application as a cell [ as opposed to disease patients, such as a retina degenerative disease, for example, degeneratio pigmentosa retinae age-related macular degeneration, amotio retinae, glaucoma, and vasa-sanguinea-retinae obstruction, in the retinal nerve cell of this invention ] for transplantation is expected.

---

[Translation done.]

\* NOTICES \*

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

#### DESCRIPTION OF DRAWINGS

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] Drawing 1 is a figure showing neural sphere obtained from the fetus rat retina.

[Drawing 2] Drawing 2 is a figure showing the cell which carried out after-introduction differentiation inducing of the Crx gene using the adenovirus vector. The cell which revealed the opsin which is a marker of visual cells is accepted.

---

[Translation done.]

\* NOTICES \*

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

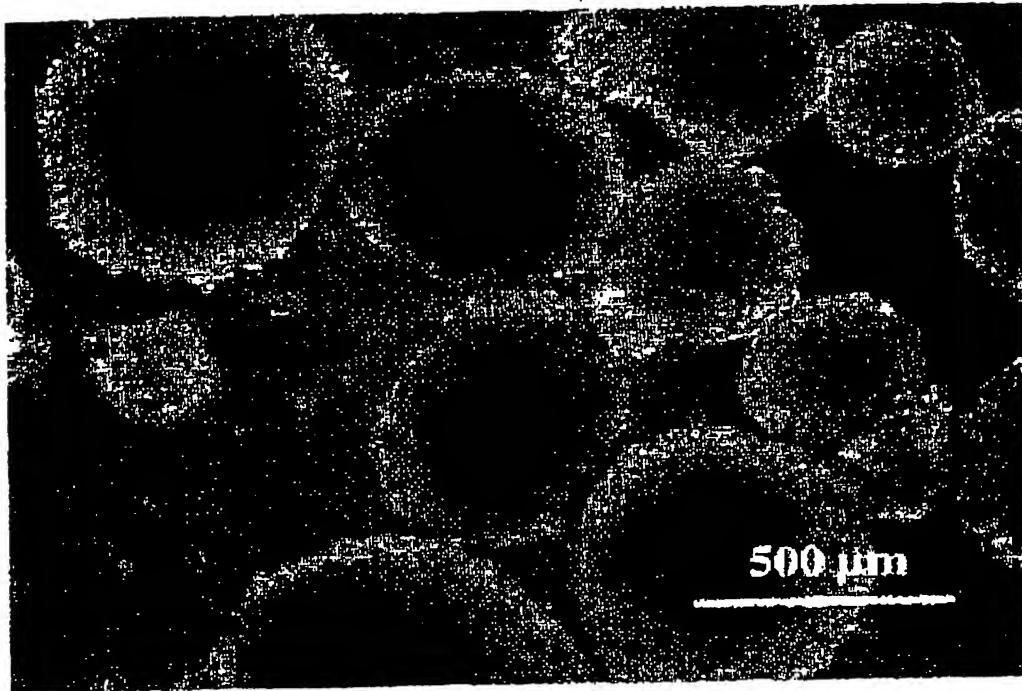
1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

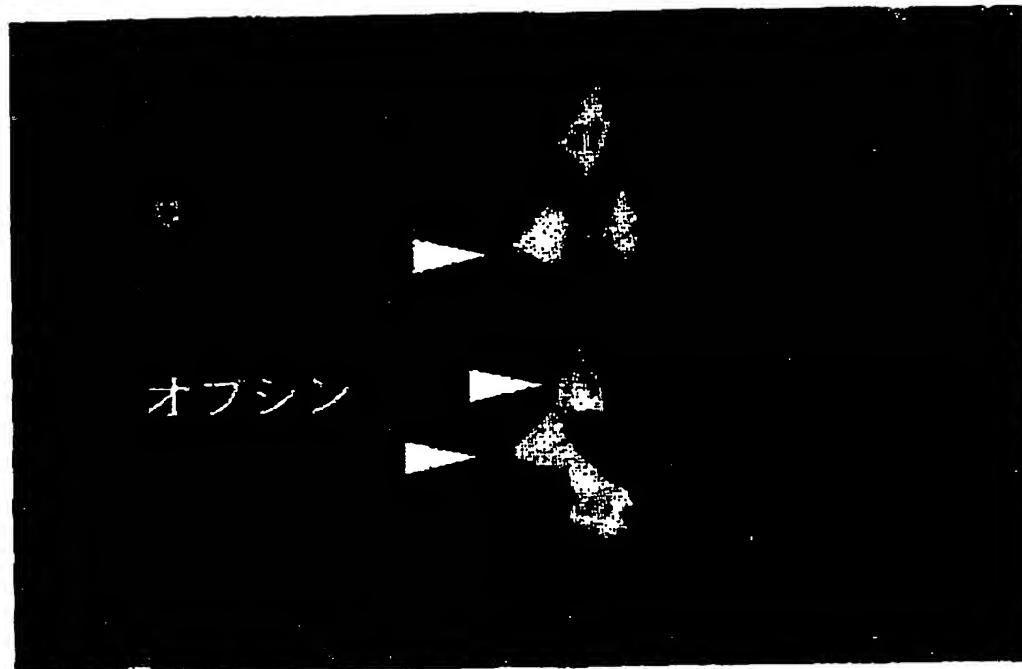
#### DRAWINGS

---

[Drawing 1]



[Drawing 2]



---

[Translation done.]

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号  
特開2002-325571  
(P2002-325571A)

(43)公開日 平成14年11月12日 (2002.11.12)

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード* (参考)
C 12 N 15/09		A 61 K 35/44	4 B 0 2 4
A 61 K 35/44		35/48	4 B 0 6 5
35/48		48/00	4 C 0 8 4
48/00		A 61 P 27/02	4 C 0 8 7
A 61 P 27/02		27/06	

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 7 頁) 最終頁に統く

(21)出願番号 特願2001-133721(P2001-133721)

(22)出願日 平成13年4月27日 (2001.4.27)

特許法第30条第1項適用申請有り 2001年3月15日 発行の「Investigative Ophthalmology & Visual Science Vol. 42 No. 4」に発表

(71)出願人 500567221  
株式会社プロテック  
東京都千代田区岩本町2-5-12  
(72)発明者 高橋 政代  
京都市左京区岡崎北御所町25 ベルシャト  
ウ岡崎北御所町501号  
(72)発明者 春田 雅俊  
京都市左京区聖護院中町10 ライオンズマ  
ンション聖護院105号  
(74)代理人 100095832  
弁理士 細田 芳徳

最終頁に統く

(54)【発明の名称】 網膜の分化誘導方法

(57)【要約】

【課題】 網膜に神経幹細胞を生着、分化させ、かつ該神経幹細胞から誘導された細胞に機能を発現させること、具体的には、視細胞のマーカー又は双極細胞マーカーを発現させることができ、網膜神経細胞の分化誘導方法；並びに網膜などへの移植に好適な、視細胞のマーカー又は双極細胞マーカーを呈する網膜神経細胞を提供すること。

【解決手段】 眼球組織由来細胞又は胚性幹細胞から、神経幹細胞又は神経前駆細胞を得、該神経幹細胞又は神経前駆細胞に、網膜特異的ホメオボックス遺伝子を導入し、得られた細胞を分化誘導条件下に培養することを特徴とする、網膜神経細胞の分化誘導方法；並びに前記網膜神経細胞の分化誘導方法により得られる網膜神経細胞。

絆細胞としての機能を発現させることが可能な手段が要求されている。

## 【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、網膜に神絆幹細胞を生着、分化させ、かつ該神絆幹細胞から誘導された細胞に機能を発現させること、具体的には、視細胞のマーカー又は双極細胞マーカーを発現させることができ、網膜神絆細胞の分化誘導方法を提供すること目的とする。また、本発明は、網膜などへの移植に好適

10 10、視細胞のマーカー又は双極細胞マーカーを呈する網膜神絆細胞を提供すること目的とする。

## 【0008】

【課題を解決するための手段】すなわち、本発明は、

【1】 眼球組織由来細胞又は胚性幹細胞から、神絆幹細胞又は神絆前駆細胞を得、該神絆幹細胞又は神絆前駆細胞に、網膜特異的ホメオボックス遺伝子を導入し、得られた細胞を分化誘導条件下に培養することを特徴とする、網膜神絆細胞の分化誘導方法、【2】 眼球組織由来細胞が、胎児神絆網膜、毛様体色素上皮細胞及び網膜色素上皮細胞からなる群より選ばれた少なくとも1種である、請求項1記載の分化誘導方法。

20 20、視細胞のマーカー又は双極細胞マーカーを呈する網膜神絆細胞を提供すること目的とする。

【1】記載の分化誘導方法、【3】網膜特異的ホメオボックス遺伝子が、Crx、Chx10、Pax6およびRaxからなる群より選ばれた少なくとも1種である、前記【1】又は【2】記載の分化誘導方法、【4】分化誘導条件が、レチノイン酸と血清との存在下における培養である、前記【1】～【3】いずれか1項に記載の分化誘導方法、【5】分化誘導条件が、レチノイン酸と血清との存在下に、N<sub>2</sub>サプリメントを含有したDMEM/F12で培養することである、前記【4】記載の分化誘導方法、【6】前記【1】～【5】いずれか1

30 30、前記【1】～【5】いずれか1項に記載の網膜神絆細胞の分化誘導方法により得られる網膜神絆細胞、並びに【7】オプシン陽性またはPKC陽性を呈する、前記【6】記載の網膜神絆細胞、に関する。

## 【0009】

【発明の実施の形態】本発明の網膜神絆細胞の分化誘導方法は、眼球組織由来細胞から、神絆幹細胞又は神絆前駆細胞を得、該神絆幹細胞又は神絆前駆細胞に、網膜特異的ホメオボックス遺伝子を導入し、得られた細胞を分化誘導条件下に培養することに1つの大きな特徴がある。

40 40、【0010】本発明の網膜神絆細胞の分化誘導方法によれば、海馬由来神絆幹細胞を網膜に移植し分化させた場合では、発現させることができなかった視細胞又は双極細胞の機能を発現させることができるという優れた効果を発揮する。

【0011】さらに、本発明の網膜神絆細胞の分化誘導方法によれば、視細胞又は双極細胞の機能を発現する、具体的には、オプシン陽性又はPKC陽性を呈する細胞を得ることができため、網膜の再生医療に有用な細胞

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 眼球組織由来細胞又は胚性幹細胞から、神絆幹細胞又は神絆前駆細胞を得、該神絆幹細胞又は神絆前駆細胞に、網膜特異的ホメオボックス遺伝子を導入し、得られた細胞を分化誘導条件下に培養することを特徴とする、網膜神絆細胞の分化誘導方法。

【請求項2】 眼球組織由来細胞が、胎児神絆網膜、毛様体色素上皮細胞及び網膜色素上皮細胞からなる群より選ばれた1種である、請求項1記載の分化誘導方法。

【請求項3】 網膜特異的ホメオボックス遺伝子が、Crx、Chx10、Pax6およびRaxからなる群より選ばれた少なくとも1種である、請求項1又は2記載の分化誘導方法。

【請求項4】 分化誘導条件が、レチノイン酸と血清との存在下における培養である、請求項1～3いずれか1項に記載の分化誘導方法。

【請求項5】 分化誘導条件が、レチノイン酸と血清との存在下に、N<sub>2</sub>サプリメントを含有したDMEM/F12で培養する条件である、請求項4記載の分化誘導方法。

【請求項6】 請求項1～5いずれか1項に記載の網膜神絆細胞の分化誘導方法により得られる網膜神絆細胞。

【請求項7】 オプシン陽性またはPKC陽性を呈する、請求項6記載の網膜神絆細胞。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、網膜への移植、特に、自家移植に適した細胞を提供しうる、網膜神絆細胞の分化誘導方法及び該分化誘導方法により得られる網膜神絆細胞に関する。

## 【0002】

【従来の技術】近年、脳・脊髄における神絆幹細胞の存在が認められるようになり、この幹細胞を利用したパーキンソン病や網膜色素変性に対する移植治療、神絆の再生医療などに期待が寄せられている。

【0003】神絆幹細胞に関して、ラットやマウスの神絆幹細胞を用いた移植実験では、脳内に移植された神絆幹細胞が適切な位置に移動してニューロンやグリアに分化することが報告されている。

【0004】眼科領域における再生医療においては、成体ラット海馬由来神絆幹細胞を、神絆の分化が進行中である生後2～7日のラットの硝子体腔内に注入した場合、該神絆幹細胞が網膜へ遊走し、生着して、各種網膜細胞様細胞に分化し、神絆纖維も再生することが知られている。

【0005】しかしながら、網膜神絆細胞として機能するまでは、分化せず、光を認識するという網膜神絆細胞の機能の発現には至っていないのが現状である。

【0006】したがって、網膜に神絆幹細胞を生着、分化させ、かつ該神絆幹細胞から誘導された細胞に網膜神

M、セレン酸ナトリウム 30nMが挙げられる。

【0022】bFGF含有無血清培地における培養における温度、酸素濃度、二酸化炭素濃度などの条件は、細胞に応じて適宜設定することができる。

【0023】網膜特異的ホメオボックス遺伝子としては、発生過程において、眼の領域特異的な発現様式を有し、かつ領域特異的な形態形成を制御する遺伝子、分化形質の発現に関与する遺伝子が挙げられる。具体的には、Crx、Chx10、Pax6、Raxなどが挙げられる。

10 10 本発明の分化誘導方法においては、神経幹細胞又は神経前駆細胞への導入により視細胞マーカーを発現させることができると観点から、好ましくは、Crx又はChx10が挙げられ、双極細胞マーカーを発現させることができると観点から、好ましくは、Chx10が挙げられる。なお、前記Crxの塩基配列は、GenBankアクセッション番号：U77615に示される。

【0024】神経幹細胞又は神経前駆細胞への前記網膜特異的ホメオボックス遺伝子の導入方法としては、例えば、アデノウイルスベクターを用いる遺伝子導入方法、

20 20 エレクトロポレーション、レトロウイルスベクターを用いる遺伝子導入方法、アデノ随伴ウイルスを用いる遺伝子導入方法、リポフェクション、エレクトロポレーションなどが挙げられる。導入効率の観点から、好ましくは、アデノウイルスベクターを用いる遺伝子導入方法及びレトロウイルスベクターを用いる遺伝子導入方法が望ましい。

【0025】ついで、遺伝子導入された神経幹細胞又は神経前駆細胞を網膜神経細胞への分化に適した分化誘導条件下に培養する。

30 30 【0026】前記分化誘導条件としては、レチノイン酸と血清との存在下における培養などが挙げられる。ここで、培養に用いられる培地としては、N<sub>2</sub>サブリメントを含有したDMEM/F12培地などが挙げられる。また、培養時の温度、酸素濃度、二酸化炭素濃度などの条件は、細胞に応じて適宜設定することができる。

【0027】前記レチノイン酸の使用量は、0.1μM以上であり、好ましくは、0.5μM以上であることが望ましく、10μM以下であり、好ましくは、5μM以下であることが望ましい。

40 40 【0028】また、前記血清の使用量は、分化誘導時には、1%程度であることが望ましい。

【0029】分化誘導条件下における遺伝子導入された神経幹細胞又は神経前駆細胞の培養により分化した細胞は、導入した遺伝子が、Crx遺伝子である場合、視細胞のマーカーであるオプシン陽性を呈し、かつ神経細胞のマーカーであるβ-IIIチューブリン陽性、GFP陽性などを呈するという特徴を有し、導入した遺伝子が、Chx10遺伝子である場合、双極細胞のマーカーであるPCK陽性を呈し、かつ神経細胞のマーカーであるβ-IIIチューブリン陽性、GFP陽性などを呈す

を開発することができるという優れた効果を発揮する。

【0012】本発明の分化誘導方法において、神経幹細胞又は神経前駆細胞を得るのに用いられる組織は、得られた細胞に網膜特異的ホメオボックス遺伝子を導入することにより、視細胞のマーカー、例えば、オプシン、又は双極細胞のマーカー、PCKを発現しうる組織であればよく、具体的には、眼球組織、より具体的には、眼胚内層などが挙げられる。また、かかる組織は、成体由来であっても、胎生期の個体由来であってもよい。

【0013】また、本発明の分化誘導方法においては、胚性幹細胞を用い、該胚性幹細胞から、神経幹細胞又は神経前駆細胞を得てもよい。

【0014】前記胚性幹細胞から、神経幹細胞又は神経前駆細胞に誘導する方法としては、例えば、川崎、笹井らの文献 [Kawasaki, H., Sasai Y., Neuron., 2000 Oct; 28(1):31-40] などに記載の手法などが挙げられる。なお、胚性幹細胞の培養、維持などの条件は、例えば、「分子生物学プロトコール」、南江堂発行などを参照できる。

【0015】前記組織由来細胞としては、胎児神経網膜、毛様体色素上皮細胞、網膜色素上皮細胞などが挙げられる。

【0016】前記組織由来細胞は、例えば、適切な手段で摘出した組織を、Dispase、EDTAなどで処理し、ついで、トリプシン処理して単一の細胞まで分離し、さらに、適切な培地でコンフルエントになるまで培養し、得られた細胞をトリプシン処理及びコラゲナーゼ処理することにより採取されうる。ここで、細胞の採取に際して、培養を行なう場合、後述の塩基性線維芽細胞増殖因子を含有した培地、表皮細胞成長因子を含有した培地、LIF（白血球遊走阻止因子）を含有した培地などの培地を用いることができる。

【0017】神経幹細胞又は神経前駆細胞は、ネスチン等のマーカーを発現する。

【0018】かかる毛様体色素上皮細胞由来の神経幹細胞又は神経前駆細胞も本発明の範囲に含まれる。

【0019】なお、前記神経幹細胞又は神経前駆細胞は、これを含むneural sphereとして得られる場合があるが、本発明においては、かかるneural sphereを以下の遺伝子導入、神経への分化誘導に供してもよい。

【0020】前記塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）を含有した無血清培地〔以下、bFGF含有無血清培地という〕としては、N<sub>2</sub>サブリメントを含有したDMEM/F12などが挙げられる。かかる培地における前記塩基性線維芽細胞増殖因子の含有量は、10ng/ml以上、好ましくは、20ng/ml以上、より好ましくは、40ng/ml以上であることが望ましい。

【0021】N<sub>2</sub>サブリメントとしては、インスリン5μg/ml、トランスフェリン100μg/ml、プロジェストロン20nM、プロレッシン100μ

るという特徴を有する。したがって、かかる細胞を網膜神経細胞として、用いることができる。本発明には、かかる分化誘導方法により得られた網膜神経細胞も含まれる。

【0030】本発明の分化誘導方法により得られた網膜神経細胞は、網膜変性疾患、例えば、網膜色素変性、加齢黄斑変性、網膜剥離、網膜内障、網膜血管閉塞症などの疾患患者に対する移植用細胞としての応用が期待される。さらに、本発明により得られる神経幹細胞は、均一で十分量の細胞が得られ、凍結保存ができるので、計画的な治療を可能にするという利点がある。

【0031】さらに、本発明の分化誘導方法によれば、サイトカインの添加や外来遺伝子の導入によって、分化の方向を変えることも期待される。

【0032】

【実施例】実施例1

(1) 網膜の培養

胎生18日齢のラット網膜又は胎生11週齢のヒト網膜を摘出した。20ng/ml 塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)を含有した無血清培地〔組成:DMEM/F12+N<sub>2</sub>サプリメント〕を用いて、5%CO<sub>2</sub>、20%O<sub>2</sub>の下、37℃で培養した。十分に細胞が増殖したところで、培養物を0.125%トリプシン〔Gibco社製〕により、37℃で5分処理し、つづいて、コラーゲンコートディッシュ上〔培地組成:DMEM/F12+N<sub>2</sub>サプリメント+bFGF〕で5%CO<sub>2</sub>、20%O<sub>2</sub>の下、37℃で30日間、継代培養した。なお、ヒト胎児網膜の研究に関しては京都大学医の倫理委員会の承認を受け行なった。また、以下、N<sub>2</sub>サプリメントは、インスリン 5μg/ml、トランスフェリン 100μg/ml、プロジェストロン 20nM、ブトレッシン 100μM、セレン酸ナトリウム 30nMである。

【0033】分化誘導に際しては、培養物の培地からbFGFを除去し、牛胎仔血清(FBS)とレチノイン酸を添加した培地〔組成:DMEM/F12+N<sub>2</sub>サプリメント+0.5μM RA〕で5%CO<sub>2</sub>、20%O<sub>2</sub>の下、37℃で2週間培養した。

【0034】その結果、驚くことに、図1に示すように、ラット及びヒトの胎児網膜から、海馬由来神経幹細胞と同様の方法で、神経幹細胞を含むと考えられているneural sphereを分離培養することができる。

【0035】ついで、neural sphereを4%パラフォルムアルデハイドで、スライドグラスに固定後、凍結切片を作製した。

【0036】得られた切片について、神経幹細胞のマーカーとされているネスチニンに対する抗体〔Pharmingen社製〕で免疫染色を行なった。

【0037】その結果、ほぼすべての細胞がネスチニン陽

性であることが示される。さらに、レチノイン酸で分化誘導後は、β-IIIチューブリン、GFP陽性細胞が見られ、幼若な神経や、グリア細胞に分化することが示される。

【0038】(2) 毛様体色素上皮細胞からの神経分化誘導

3~4週齢DAラットの眼球を摘出し、赤道部よりやや前方の強膜を輪状に切開して前眼部を分離した。網膜を完全に除去したのち、レンズ及び毛様体無色素上皮細胞を取り除いた。毛様体組織を単離したのち、それぞれの組織を、Dispase(1000U/ml)により37℃で15分処理し、ついで、0.05%EDTAにより、室温で20分処理した。

【0039】一部の毛様体組織については、ラミニンコートしたディッシュ上で色素上皮細胞側が下面になるようにして接着させ、前記bFGF含有無血清培地を用いて、5%CO<sub>2</sub>、20%O<sub>2</sub>の下、37℃で20日間接着培養を行なった。

【0040】神経への分化誘導のためには、引き続いで、培地を、牛胎仔血清含有培地〔組成:DMEM/F12+N<sub>2</sub>サプリメント+レチノイン酸〕に交換して、同様に培養を継続した。

【0041】その結果、毛様体色素上皮細胞からneural sphere様の細胞が得られた。神経への分化誘導前は、ネスチニン陽性の細胞が確認され、分化誘導後はやはりβ-IIIチューブリン、GFP陽性細胞が少数ながら存在していた。

【0042】(3) 組換えアデノウイルスベクターの作製と遺伝子導入

以下、組換えアデノウイルスベクターの作製及び該ベクターによる遺伝子導入は、鐘ヶ江及び齊藤らの方法〔文献名:遺伝子導入&発現解析実験法、第27~42頁、(1997)、羊土社発行〕に従って行なった。

【0043】視細胞の特異的ホメオボックス遺伝子であるCrx遺伝子およびレポーター遺伝子であるGFP遺伝子をそれぞれ増幅し、制限酵素で切り出したそれぞれの遺伝子を発現コスミドカセットに組み込んだ。なお、Crx遺伝子、Chx10遺伝子及びGFP遺伝子について、それぞれ、Crxを保持したプラスミド、Chx10を保持したプラスミド及びGFPを保持したプラスミドのそれにより宿主大腸菌を形質転換して得られた形質転換体を用いて増幅した。

【0044】ついで、相同的組換え法により、それぞれの遺伝子を発現するアデノウイルスを作製した。ついで、得られた組換えアデノウイルスを、293細胞に感染させて増殖させ、塩化セシウムを用いたステップグレジェント法によって、ウイルスを精製した。

【0045】ついで、毛様体色素上皮細胞由来の神経幹細胞(又は神経前駆細胞)のそれに対し、精製されたCrx遺伝子発現アデノウイルス、Chx10遺伝子

7  
発現アデノウイルス又はGFP遺伝子発現アデノウイルスを感染させた。

【0046】得られた感染細胞を、神経分化条件〔DMEM/F12+N<sub>2</sub>サプリメント+1%FBS+20ng/ml bFGFの条件〕下に、引き続き培養した。

【0047】Crx遺伝子発現アデノウイルス感染細胞、Chx10遺伝子発現アデノウイルス感染細胞及びGFP遺伝子発現アデノウイルス感染細胞のそれについて、以下のように、免疫細胞化学的解析により神経分化に与える効果を判定した。

【0048】培養細胞について、培地を吸引除去後、4%パラホルムアルデヒドを用いて、スライドグラスに固定し、スキムミルクを用いてブロッキングを行なった。

【0049】各種の神経マーカーとして知られる様々な一次抗体〔抗ネスチニン抗体、抗ニューロフィラメント200抗体、抗MAP5抗体、抗 $\beta$ -IIIチューブリン抗体、抗GFP抗体、抗オプシン抗体〕を至適な希釈倍率に希釈することにより得られた各希釈物と、固定化された細胞とを反応させた。ついで、蛍光標識された二次抗体〔Amersham社製〕を用いて、可視化させた。

【0050】可視化されたマーカーについて、蛍光顕微鏡で観察するとともに、その一部はコンフォーカル顕微鏡を用いて撮影記録した。結果を図2に示す。

【0051】図2に示すように、アデノウイルスベクターを用いてCrx又はChx10を導入後、分化誘導した場合、Crxを導入した場合、視細胞のマーカーであるオプシン陽性の細胞が見られ、Chx10を導入した場合、双極細胞のマーカーであるPCK活性が見られることがわかる。一方、遺伝子を導入しなかった場合、あ

るいはアデノウイルスベクターでGFP(green fluorescein protein)遺伝子を導入した後、分化誘導した場合においては、オプシン陽性細胞が認められなかった。

【0052】以上の結果より、ラット胎仔網膜及びヒト胎児網膜、ラット毛様体上皮から未分化な神経幹細胞(又は神経前駆細胞)が得られることが示唆される。また、分化誘導により、神経幹細胞(又は神経前駆細胞)の一部が、神経とグリアに分化することが示唆される。

10 10  
さらに、ホメオボックス遺伝子、例えば、Crx遺伝子を導入することにより、視細胞のマーカーであるオプシン陽性の細胞が得られ、例えば、Chx10遺伝子を導入することにより、双極細胞のマーカーであるPCK陽性の細胞が得られることが示される。

### 【0053】

【発明の効果】本発明の分化誘導方法によれば、網膜に神経幹細胞を生着、分化させ、かつ該神経幹細胞から誘導された細胞に機能を発現させること、具体的には、視細胞のマーカー又は双極細胞を発現させることができる

20 20  
という優れた効果を奏する。また、本発明の網膜神経細胞は、網膜変性疾患、例えば、網膜色素変性、加齢黄斑変性、網膜剥離、緑内障、網膜血管閉塞症などの疾患者に対する移植用細胞としての応用が期待される。

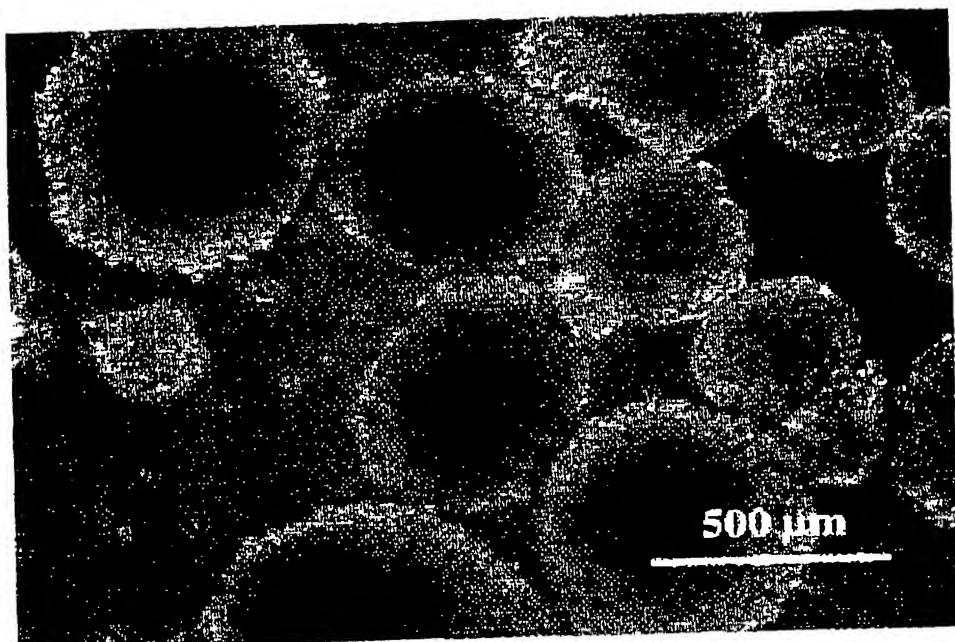
### 【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、胎仔ラット網膜から得られたneuronal sphereを示す図である。

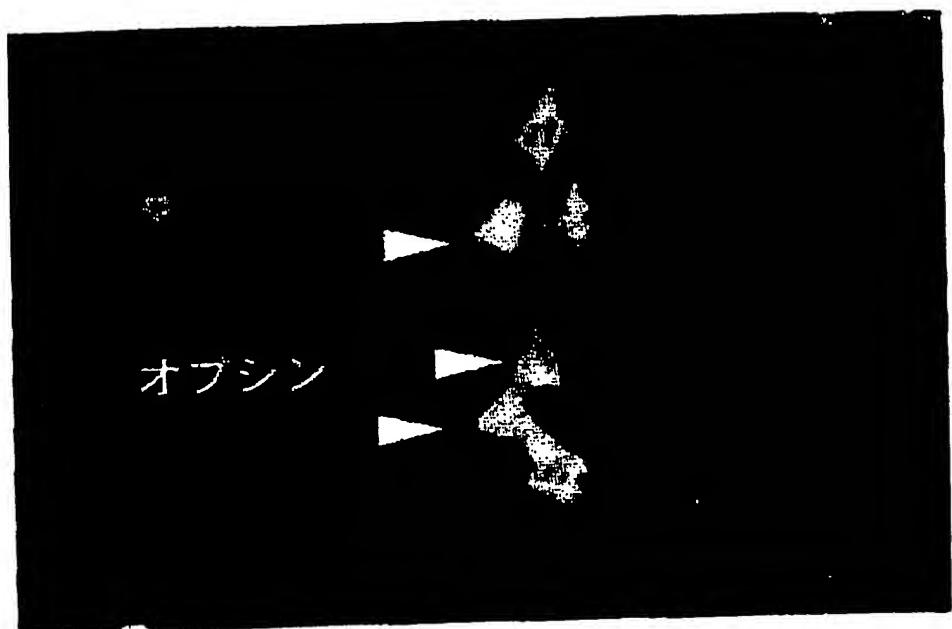
【図2】図2は、アデノウイルスベクターを用いてCrx遺伝子を導入後分化誘導した細胞を示す図である。視細胞のマーカーであるオプシンを発現した細胞を認める。

30  
30

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	マークコード (参考)
A 6 1 P 27/06		C 1 2 N 15/00	A
C 1 2 N 5/10		5/00	B

F ターム (参考) 4B024 AA01 BA80 CA01 CA04 DA02  
EA02 EA04 FA02 FA10 GA11  
HA17  
4B065 AA90X AA93Y AB01 BA01  
BB25 BB32 BB34 CA44  
4C084 AA13 NA14 ZA332  
4C087 AA01 AA02 AA03 BB56 BB57  
CA04 NA14 ZA33